

ÜBER DIE VERDRÄNGUNG VON PHENOTHIAZINDERIVATEN
AUS IHRER ALBUMINBINDUNG

vorgelegt von
Wolfgang Meiler

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. G. Kuschinsky)

ÜBER DIE VERDRÄNGUNG VON PHENOTHIAZINDERIVATEN
AUS IHRER ALBUMINBINDUNG

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von

Wolfgang Meiler

aus Höhr-Grenzhausen/Unterwesterwaldkreis

M a i n z 1971

Dekan: Prof. Dr. A. Mayet
Referent: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
Korreferent: Prof. Dr. G. Kuschinsky
Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.1972



gesamtherstellung
ditters bürodienst
mainz

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	3
2.1. Verwendete Substanzen	3
2.2. Bestimmung der Eiweißbindung mit Hilfe der Sephadexgel- filtration	5
2.3. Bestimmung des Eiweiß- und Phenothiazingehaltes	10
3. Versuchsergebnisse	12
3.1. Beschreibung der Ergebnisse	12
3.2. Statistische Auswertung der Ergebnisse	14
3.3. Abbildungen	16
3.4. Tabellen	19
4. Diskussion	26
4.1. Allgemeine Betrachtung von Verdrängungsreaktionen an den Bindungsstellen der Plasmaproteine	26
4.2. Beschreibung der Albumin- bindung der untersuchten Pheno- thiazine auf Grund von Literaturbefunden	29
4.3. Deutung des phenothiazinalbumin- komplexes nach den vorliegenden Ergebnissen	33
5. Zusammenfassung	34
6. Literaturverzeichnis	36

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Die Bindung von Arzneimitteln an Albumin wurde bisher in zahlreichen Veröffentlichungen in erster Linie wegen ihrer pharmakokinetischen Bedeutung untersucht. Im Blut werden die meisten niedermolekularen Substanzen in unterschiedlichem Maße an die Plasmaeweißkörper gebunden. Durch das Ausmaß der Proteinbindung können Wirkungseintritt, Wirksamkeit, Wirkungsdauer, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung eines Pharmakons beeinflusst werden. Ausführliche Literaturangaben sind in folgenden Übersichtsarbeiten zu finden: Goldstein, 1949; Meyer u. Guttman, 1968; Krieglstein, 1969.

Der Arzneimittelalbuminkomplex kann jedoch auch als Modell betrachtet werden, um allgemeine grundsätzliche Kenntnisse über die Arzneimittelproteinbindung zu gewinnen. Allgemeine Gesetzmäßigkeiten der Proteinbindung, die von diesem Modell gewonnen werden, könnten zumindest teilweise auf den Arzneimittelrezeptorkomplex angewandt werden, vorausgesetzt, daß der Rezeptor eine Proteinstruktur hat.

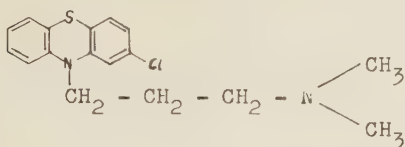
Wenn Pharmaka Affinitäten zu den gleichen Bindungsstellen am Albuminmolekül besitzen, kann es zu einer Konkurrenz um diese Bindungsstellen kommen, das heißt, die beiden Pharmaka können sich gegenseitig aus ihrer Eiweißbindung verdrängen. Dadurch steigt der freie Anteil der Arzneimittel an. Verdrängungsreaktionen an den Bindungsstellen der Plasmaproteine wurden bereits vielfach beschrieben. Zunächst wurde eine gegenseitige verdrängung aus der Eiweißbindung vorwiegend für anionische Substanzen wie Phenylbutazon, Tromexan, Dicumarol, Sulfinpyrazol, Salicylsäure u.a. gefunden (Anton, 1961; Christensen et al., 1963; Kunin, 1964 u. 1965; Brodie, 1965; Büttner u. Portwich, 1967; Aggeler et al., 1967; Solomon et al., 1968). Man hat daraus den

Schluß gezogen, daß dem Arzneimittelproteinkomplex primär eine Ionenbindung zugrunde läge (Keen, 1966). In Untersuchungen von Jähnchen et al. (1969) und Franz et al. (1969) konnten die basischen Phenothiazinderivate vorwiegend durch saure Substanzen aus ihrer Albuminbindung verdrängt werden. Die Theorie von der primären Ionenbindung der Arzneimittel am Eiweiß mußte deshalb verworfen werden.

Verdrängungsreaktionen von Arzneimitteln mit ähnlicher chemischer Struktur an den Bindungsstellen der Plasmaproteine stellen also eines der Hilfsmittel dar, um die Gruppen eines Arzneimittelmoleküls, die an der Bindung beteiligt sind, zu identifizieren und um die Bindungskräfte, die bei der Wechselwirkung von Arzneimitteln mit Protein wirksam werden, zu charakterisieren. Im Falle einer hydrophoben Wechselwirkung der Phenothiazinbenzolringe mit dem Eiweiß werden die Phenothiazinderivate durch einfache aromatische Substanzen, die ebenfalls vom Albumin gebunden werden, verdrängt. Eine Reihe von aromatischen Verbindungen, wie Benzoesäure, Anilin, Salicylsäure und 2,6 Dihydroxybenzoesäure zeigten in früheren Untersuchungen Konkurrenzreaktionen um Bindungsplätze des Promazin am Albumin. Analoge alicyclische Substanzen, wie Cyclohexylamin, konnten dagegen die Eiweißbindung nicht beeinflussen (Jähnchen et al., 1969). Wenn die Phenothiazinderivate durch ihre Seitenkette an der Bindung beteiligt wären, sollten Substanzen, die ähnliche Strukturen wie die Seitenkette aufweisen und damit unter Umständen ähnliche Bindungsstellen besitzen, mit der Seitenkette um Bindungsplätze am Albuminmolekül konkurrieren können. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussbarkeit der Eiweißbindung von Perazin, Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin durch Acetylsalicylsäure und von Chlorpromazin und Perazin durch Hydroxyzin untersucht, um so weitere Kenntnis über die Natur des Phenothiazinalbuminkomplexes und Anhaltspunkte für eine Beteiligung der Seitenkette an der Eiweißbindung der Phenothiazinderivate zu erhalten.

2. METHODIK

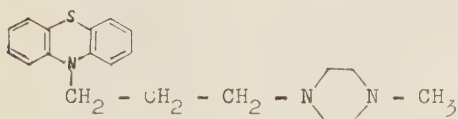
2.1. Folgende Substanzen wurden verwendet:



2 - Chlor - 10 - (3' - dimethylaminopropyl)- phenothiazin - hydrochlorid

Chlorpromazin, Megaphen ^(R) (Bayer, Leverkusen)

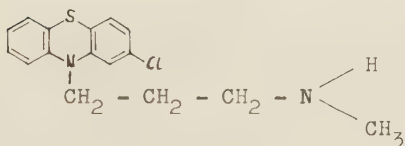
Mol. - Gew.: 355.3



10 - [3 - (4 - Methyl - 1 - piperazinyl) - propyl] - phenothiazindimaleat

perazin, Taxilan ^(R) (Promonta, Hamburg)

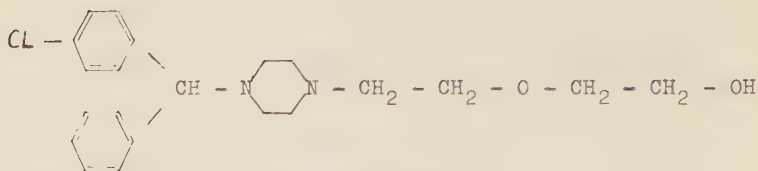
Mol. - Gew.: 571.7



2 - Chlor - 10 - (3' - methylaminopropyl) - phenothiazin - hydrochlorid

Desmethylchlorpromazin (Rhône Poulenc, Paris)

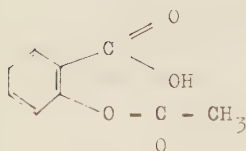
Mol. - Gew.: 420.9



1 (p - chlor - α - phenylbenzyl - 4 - (2 - hydroxy
äthoxyäthyl) - piperazin dihydrochlorid

Hydroxyzin, Atarax ^(R) (UCB Chemie, Sindorf)

Mol. - Gew.: 447.9



Acetylsalicylsäure (DAB 7; Bayer, Leverkusen)

Als Eiweiß wurde Rinderserumalbumin (Albumin vom Rind,
trocken, "reinst", Beringwerke, Marburg) verwendet.

Die als Lösungs- und Elutionsmittel verwendete Standard-
pufferlösung enthielt außer 0,02 M Phosphatpufferlösung
nach Sörensen 0,9% Natriumchlorid und 0,05% Natrium-
thiosulfat.

2.2. Bestimmung der Eiweißbindung mit Hilfe der Sephadexgelfiltration

Die Eiweißbindung der Phenothiazine wurde mit Hilfe der Sephadexgelfiltration nach Krieglstein und Kuschinsky (1968) bestimmt. Sephadex ist ein dreidimensional vernetztes Polysaccharid, das durch Quervernetzung der linearen Makromoleküle von Dextran erhalten wird. Sephadex ist indifferent gegenüber Kationen und Anionen, enthält viele Hydroxylgruppen, quillt stark in Wasser oder Elektrolytlösung und bildet ein Gel mit einer Vielzahl von Poren, deren Größe vom Vernetzungsgrad abhängt. Bei der Sephadexgelfiltration handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren der Fraktionierung nach Molekülgröße, das auf einer eingeschränkten Diffusion der Moleküle in einer mit Gelpartikeln gefüllten Säule beruht. Die von diesen bei der Quellung aufgenommene Flüssigkeit ist für Moleküle unterschiedlicher Größe in einem von der Porosität abhängigen Maße verfügbar. Auf diese Weise ist die Verteilung gelöster Stoffe innerhalb und außerhalb der Gelpartikel nicht durch Differenzen in der Löslichkeit, sondern durch den im Innern zugänglichen Volumenanteil und durch das äußere Volumen bestimmt. Moleküle, die größer sind als die größten Poren des gequollenen Gels, können die Gelpartikel nicht durchdringen und wandern an diesen vorbei; sie verlassen die Säule zuerst. Kleinere Moleküle dagegen durchdringen einen mehr oder weniger großen Teil der Gelpartikel. Je kleiner die Moleküle sind, um so mehr Poren sind für sie im Gel zugänglich; sie erscheinen daher im Eluat in der Reihenfolge abnehmender Molekülgröße (Römpp, 1966). Abb. 1 zeigt schematisch das Prinzip der Gelfiltration mit Sephadex. Im chromatographischen Prozeß der Sephadexgelfiltration wird also der ungebundene Anteil des Pharmakons von dem Albumin und dem Albuminarzneimittelkomplex aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße abgetrennt.

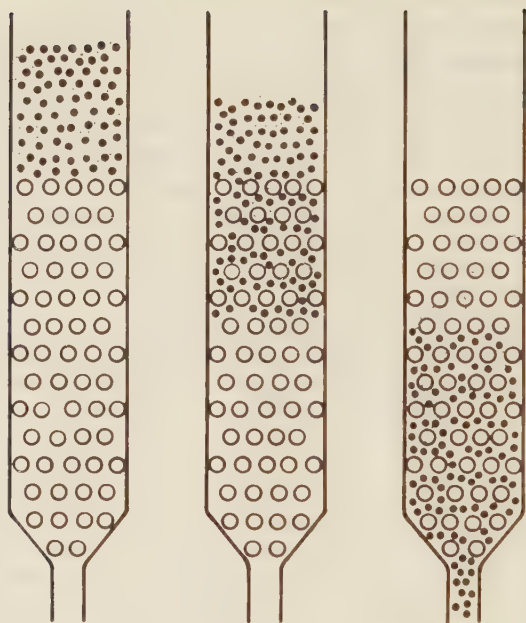


Abb. 1

Prinzip der Gelfiltration mit Sephadex

Läßt man eine wäßrige Lösung von großen und kleinen Molekülen als Zone in die Gelpackung einsickern und wäscht mit Wasser nach, so haben die kleinen Moleküle, die in die Gelkörner hineindiffundieren, einen längeren Weg zurückzulegen als die großen, die nur außen daran entlangwandern.

Die Porengröße des Sephadexgels wurde so gewählt, daß nur die freien Arzneimittelmoleküle in die Poren des Sephadexgels eindringen können. Sie werden dadurch infolge ihrer längeren Wegstrecke durch die innere Phase des Maschenwerkes in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verzögert und so aus der schneller wandernden Eiweißzone herauschromatographiert. Die Konzentration an freiem Arzneimittel, die von der Säule eluiert wird, nachdem das Albumin und der Albuminarzneimittelkomplex mit einem geringen Teil des freien Pharmakons die Säule passiert haben, entspricht seiner Konzentration im Gleichgewichtszustand, da sich das gestörte Gleichgewicht durch Dissoziation des Komplexes aus Eiweiß und Substanz sofort neu einstellt. Nach Krieglstein und Kuschinsky (1968) können auch reversibel an Sephadex adsorbierte Arzneimittel, wie zum Beispiel Chlorpromazin und Perazin, mit dieser Methode bestimmt werden.

Die vorliegenden Versuche wurden mit Säulen von 20 cm Länge und 1,2 cm Durchmesser mit Sephadex G 50 fein (Pharmacia, Uppsala) durchgeführt. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Phenothiazinderivate wurden Chromatographierohre aus braunem Glas verwendet. 20 ml eines Lösungsansatzes wurden auf eine Sephadexsäule gebracht. Vor der Bestimmung der Eiweißbindung wurde der pH Wert des Lösungsansatzes mit einem Präzisions- pH - Meter der Firma Knick (Berlin) potentiometrisch kontrolliert und gegebenenfalls mit 0,1 N Natronlauge beziehungsweise 0,1 N Salzsäure auf pH 7,40 eingestellt. Der in den vorliegenden Versuchen jeweils untersuchte Lösungsansatz enthielt Perazin, Chlorpromazin oder Desmethylchlorpromazin (10^{-4} M) und Rinder-serumalbumin (1g%-ig) in Standardpuffer gelöst. Da in den Versuchen festgestellt werden sollte, in welchem Ausmaß die Phenothiazinalbuminbindung durch bestimmte Substanzen beeinflusst wird, enthielt der Lösungsansatz außerdem jeweils Hydroxyzin oder Acetylsalicylsäure.

Die Konzentration des Phenothiazinderivates innerhalb einer Versuchsreihe blieb konstant bei 10^{-4} M, während die Konzentration von Hydroxyzin oder Acetylsalicylsäure als verdrängende Substanzen von $2 \cdot 10^{-4}$ M bis $2 \cdot 10^{-3}$ M gesteigert wurde. Kontrollbestimmungen wurden jeweils ohne zusätzliche Substanzen, nur mit dem jeweiligen Phenothiazin-derivat ausgeführt. In einer Versuchsserie sollte festgestellt werden, ob sich Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin in ihrer Eiweißbindung gegenseitig beeinflussen. Dazu enthielt der Lösungsansatz zu Beginn neben der 1%igen Albuminlösung gemeinsam Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin. Die Konzentration von Chlorpromazin wurde in den Lösungen von 0 bis 10^{-4} M steigend und jeweils entsprechend die Konzentration von Desmethylchlorpromazin von 10^{-4} M bis 0 fallend verändert, so daß die Gesamtphenothiazinkonzentration in jedem einzelnen Lösungsansatz 10^{-4} M betrug. Bestimmt wurde der prozentuale Anteil an freiem Phenothiazin, der also einen Anteil von freiem Chlorpromazin und freiem Desmethylchlorpromazin einschließt. Die Säulen wurden bei Zimmertemperatur mit Standardpuffer pH 7,40 eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 18 ml/h. Das Eluat wurde fraktioniert zu 3 ml aufgefangen. Der Eiweiß- und Phenothiazingehalt wurde in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Bei einer Konzentration an Hydroxyzin beziehungsweise Acetylsalicylsäure wurden jeweils zwei einzelne Bestimmungen durchgeführt und die Mittelwerte aus den Einzelbestimmungen errechnet. Die zugesetzten Pharmaka haben keinen Einfluß auf Nachweis, Extraktion und Gelfiltration der Phenothiazinderivate. Die Ergebnisse eines Gelfiltrationsversuches sind als Beispiel in Abb. 2 dargestellt. Die Elutionskurve wurde in einem Gelfiltrationsversuch mit einer 20 cm langen und 1,2 cm im Durchmesser breiten Säule mit Sephadex G 50 erhalten. 20 ml einer Probelösung, die 10^{-4} M Chlorpromazin und 1g/100 ml Rinderserumalbumin enthielt, wurden auf die Säule gegeben.

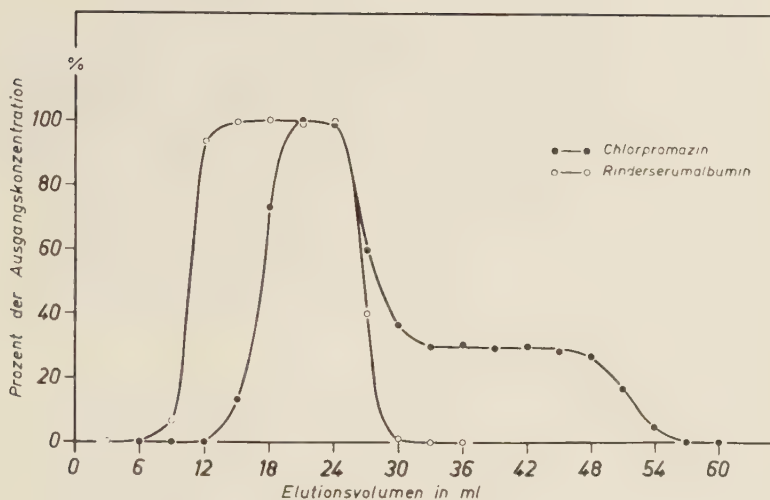


Abb. 2

Beispiel eines Gelfiltrationsversuchs

Elutionskurve, die in einem Gelfiltrationsversuch mit einer 20 cm langen und 1,2 cm im Durchmesser breiten Säule mit Sephadex G 50 erhalten wurde. 20 ml einer Probelösung, die 10^{-4} M Chlorpromazin und 1 g/100 ml Rinderserumalbumin enthielt, wurden auf die Säule gegeben. Ordinate: prozentualer Anteil der Ausgangskonzentration an Albumin und Chlorpromazin. Abszisse: Elutionsvolumen in ml.

Das gebundene Arzneimittel wandert mit der Geschwindigkeit des Albumins. Die Substanz erreicht innerhalb der Eiweißzone (entsprechend dem Elutionsvolumen von 10 bis 25 ml in Abb. 2) 100% der Ausgangskonzentration, fällt dann gleichmäßig mit der Eiweißkonzentration ab und nimmt in den folgenden eiweißfreien Fraktionen einen konstanten Wert ein. Diese Plateauzone der Gelfiltrationskurve, die auf die Eiweißzone folgt, gibt die Konzentration an ungebundenem Arzneimittel an, die in der Säule mit dem Arzneimittelalbuminkomplex im Gleichgewicht war. Wenn Versuche in Serien für eine Substanz durchgeführt wurden, wurden nur die Fraktionen nach der Eiweißzone auf Phenothiazin untersucht, was in Abb. 2 einem Elutionsvolumen zwischen 25 und 50 ml entspricht.

2.3. Bestimmung des Eiweiß- und Phenothiazingehaltes

2.3.1. Der Eiweißgehalt im Eluat wurde refraktometrisch gemessen.

2.3.2. Zur quantitativen Bestimmung der Phenothiazinderivate wurden 2 ml der zu untersuchenden Lösung mit 1ml 1N Natronlauge alkalisch gemacht und mit 10ml n-Heptan, das 1,5 vol.% Isoamylalkohol enthielt, eine halbe Stunde maschinell geschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde anschließend bei 0 Grad Celsius zentrifugiert. Aus 5 ml der organischen Phase wurden mit 2 ml 50%iger Schwefelsäure, die 10 mg% Eisen - III - chlorid enthielt durch 5 Min. schütteln die Arzneimittel wieder extrahiert. Die organische Phase wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Extinktion des entstandenen roten Farbstoffes photometrisch im Photometer Elko III der Firma Zeiss mit dem Filter S 49 E für Perazin und dem Filter S53 E für Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin und zum Teil mit einem Photometer der Firma Eppendorf gemessen. Als Leerwert diente ein

Versuchsansatz, der an Stelle der Phenothiazinlösung Standardpufferlösung enthielt.

Die Konzentration an freier Substanz wurde aus der mittleren Extinktion der eiweißfreien Plateauwerte der Gelfiltrationskurve bestimmt, die der Konzentration im Gleichgewichtszustand entspricht. Der α -Wert gibt den prozentualen Anteil an freiem Phenothiazinderivat an.

3. VERSUCHSERGEBNISSE

Perazin und Chlorpromazin werden ohne Zusatz eines Pharmakons durch die 1%-ige Rinderserumalbuminlösung annähernd gleich stark gebunden. Der α -Wert von Perazin beträgt etwa 29 %, der von Chlorpromazin etwa 31 %. Perazin ist im Gegensatz zu Chlorpromazin nicht durch Chlor substituiert und trägt in der Seitenkette an Stelle der Dimethylaminogruppe einen 4 - Methylpiperazinring. Der Einfluß von Hydroxyzin auf die Bindung von Perazin und Chlorpromazin an Rinderserumalbumin wird in Abb. 3 ersichtlich (Tab. 1 u. 2). Perazin zeigt eine deutliche Abhängigkeit seiner Proteinbindung von der steigenden Hydroxyzinkonzentration. Die Regressionsgerade zeigt einen Anstieg des Anteils an freiem Perazin mit steigender Hydroxyzinkonzentration (Abb. 3). Sein α -Wert nimmt bei Erhöhung der Hydroxyzinkonzentration von 0 bis $2 \cdot 10^{-3}$ M deutlich zu, er steigt von 29,4 % auf 36,6 % an (Tab. 1). Der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Hydroxyzin, das wie Perazin einen Piperazinring in seinem Gerüst enthält, und dem α -Wert von Perazin ist statistisch signifikant ($r = 0,73$, $P < 1\%$; siehe auch statistische Auswertung Tab. 7). Hydroxyzin verdrängt also Perazin nachweislich aus seiner Eiweißbindung. Für Chlorpromazin konnte eine Abhängigkeit seines α -Wertes von der in gleichen Abständen wie in der Versuchsserie mit Perazin erhöhten Hydroxyzinkonzentrationen statistisch nicht nachgewiesen werden ($r = 0,20$, nicht signifikant; siehe Tab. 2 u. statistische Auswertung Tab. 7). Dem entspricht die Schwankung des α -Wertes um einen Betrag von 30% (Tab. 2) und der zur Abszisse parallele Verlauf der Regressionsgeraden in Abb. 3. Perazin und Chlorpromazin unterscheiden sich also deutlich in ihrer Bindung an Rinderserumalbumin in Gegenwart von Hydroxyzin (Tab. 7).

Die Abhängigkeit der Rinderserumalbuminbindung des Perazin, des Chlorpromazin und des Desmethylchlorpromazin von steigenden Acetylsalicylsäurekonzentrationen wird aus Abb. 4 ersichtlich. Perazin ebenso wie Chlorpromazin wurden durch Acetylsalicylsäure aus ihrer Bindung an Rinderserumalbumin verdrängt (statistische Prüfung Tab. 7). Ihr α -Wert nimmt in beiden Fällen zu, die Regressionsgeraden in Abb. 4 steigen an. Perazin wird durch Acetylsalicylsäure aus seiner Eiweißbindung jedoch fast doppelt so stark verdrängt wie Chlorpromazin. Acetylsalicylsäure bewirkt bei Perazin eine Zunahme des freien Anteils α von 27,7% auf 39,1%, dagegen bei Chlorpromazin nur von 30% auf 35,8% (Tab. 3 u. 4).

Durch die Monodemethylierung des Chlorpromazin wird die Affinität des Moleküls zum Albumin deutlich vermindert. Der α -Wert beträgt 37% gegenüber 30,3% bei Chlorpromazin. Desmethylchlorpromazin läßt keine Abhängigkeit seiner Proteinbindung von der in gleichen Abständen wie in der Versuchsserie mit Chlorpromazin erhöhten Acetylsalicylsäurekonzentrationen erkennen (Abb. 4 u. Tab. 5). Es wird nicht nachweislich aus seiner Bindung an Rinderserumalbumin verdrängt. Die Regressionsgerade in Abb. 4 zeigt keinen Anstieg ($r = 0,33$, nicht signifikant, statistische Auswertung Tab. 7). Der α -wert schwankt um einen Betrag von 37%. Die Proteinbindung von Chlorpromazin nimmt dagegen unter Einfluß von Acetylsalicylsäure deutlich ab (Tab. 7). Sein α -Wert nimmt in Gegenwart des Pharmakons um 5,5% zu.

Die Ergebnisse der Versuche, in denen untersucht werden sollte, ob sich Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin gegenseitig in ihrer Proteinbindung beeinflussen, sind in Tab. 6 zusammengestellt und in Abb. 5 dargestellt. Die α -Werte fallen von 37%, dem α -Wert für Desmethylchlorpromazin auf etwa 30%, den α -Wert für Chlorpromazin ab. Es ergaben sich keine Hinweise für eine gegenseitige Verdrängung von Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin aus ihrer Albuminbindung.

3. 2. Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsserien wurden statistisch geprüft. Zu den in den Tab. 1 bis 6 dargestellten Meßergebnissen wurden Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen den α -Werten und den Konzentrationen von Hydroxyzin beziehungsweise Acetylsalicylsäure und Gleichungen der Regressionsgeraden nach den bekannten Formeln berechnet (z.B. Sachs, 1968). Mit Hilfe von Tabellen (Geigy, 1960) kann geprüft werden, ob für einen gegebenen Stichprobenumfang der berechnete Korrelationskoeffizient signifikant von 0 verschieden ist, d. h. ob zwischen den einzelnen Variablen ein statistisch gesicherter linearer Zusammenhang besteht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt. Danach sind die Zusammenhänge zwischen den α -Werten von Perazin und der Konzentration von Acetylsalicylsäure bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 1\%$ signifikant, d. h. die Bindung dieser Phenothiazinderivate an Albumin wird durch die zugesetzte Substanz beeinflusst. Die Beziehungen zwischen den α -Werten von Chlorpromazin beziehungsweise Desmethylchlorpromazin und den Konzentrationen von Hydroxyzin beziehungsweise Acetylsalicylsäure erweisen sich als nicht signifikant. Dem entspricht das Bild der parallel zur Abszisse verlaufenden Regressionsgeraden. Weiter wurde geprüft, ob sich die Regressionskoeffizienten der Geraden in Abb. 3 u. 4 signifikant unterscheiden. Folgende Prüfgröße wurde berechnet:

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{S_{YX}^{(1)} + S_{YX}^{(2)}}{2(n-2)} \left(\frac{1}{S_{XX}^{(1)}} + \frac{1}{S_{XX}^{(2)}} \right)}}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$S_{y.x} = S_{yy} - b S_{xy}$$

b_i = Regressionskoeffizient der i -ten Gruppe

Die Prüfgröße $\hat{t}$ ist t-verteilt mit $2(n-2)$ Freiheitsgeraden

Es bestätigte sich, daß Perazin und Chlorpromazin durch Hydroxyzin ($t = 3,33$, Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 1\%$), Perazin und Chlorpromazin durch Acetylsalicylsäure ($t = 3,45$, Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 1\%$) und Chlorpromazin und Desmethylenchlorpromazin durch Acetylsalicylsäure ($t = 2,28$, Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 5\%$) jeweils unterschiedlich beeinflußt werden (siehe auch Tab. 7).

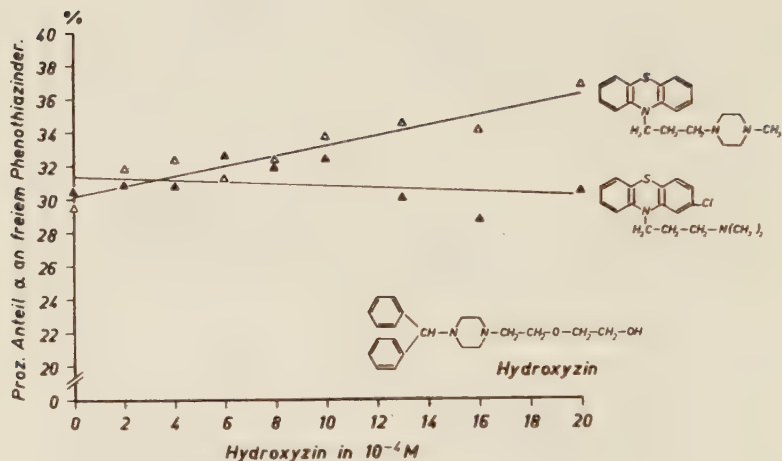


Abb. 7

Einfluß von Hydroxyzin auf die Bindung von Perazin und Chlorpromazin an Kinderserumalbumin

Ordinate: prozentualer Anteil an freiem Perazin beziehungsweise Chlorpromazin in der Albuminlösung. Abszisse: Gesamtkonzentration an Hydroxyzin ($10^{-4} M$). Alle Messungen wurden in lyser Albuminlösung (pH 7,40; $22^{\circ}C$) durchgeführt, die $10^{-4} M$ Perazin oder Chlorpromazin und unterschiedliche Konzentrationen an Hydroxyzin enthielt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Einzelversuchen dar. Die dargestellten Geraden sind die entsprechenden Regressionsgeraden (siehe statistische Auswertung Tab. 7).

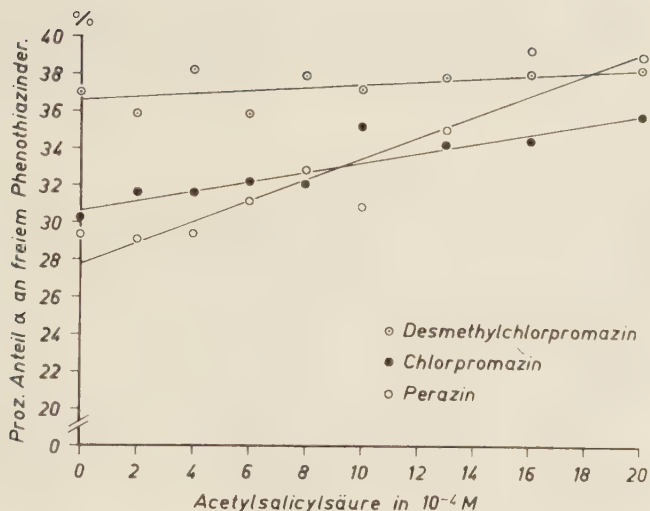


Abb. 4

Verdrängung von Perazin, Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin durch Acetylsalicylsäure aus der Bindung an Rinderserumalbumin

Ordinate: Prozentualer Anteil α an freiem Phenothiazinderivat. Abszisse: Gesamtkonzentration an Acetylsalicylsäure (10^{-4} M). Alle Messungen wurden in 1%iger Albuminlösung (pH 7,40; 22°C) durchgeführt, die eines der Phenothiazinderivate (10^{-4} M) und unterschiedliche Konzentrationen an Acetylsalicylsäure enthielt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus zwei Einzelversuchen dar. Die dargestellten Geraden sind die entsprechenden Regressionsgeraden (statistische Auswertung siehe Tab. 7).

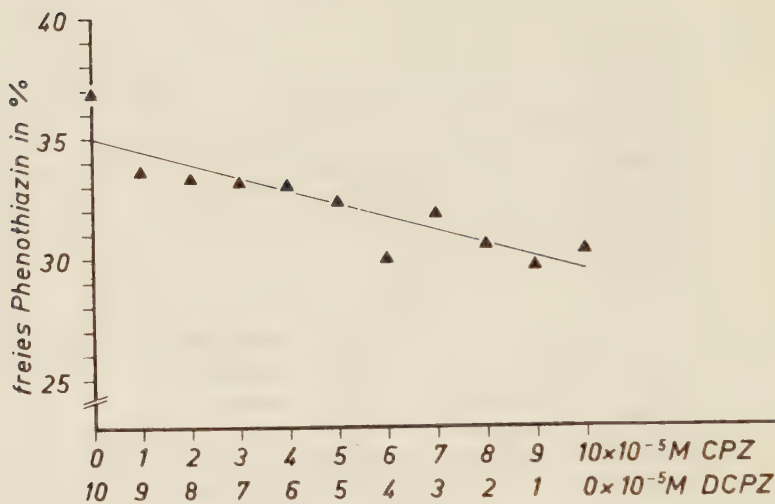


Abb. 5

Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung
für Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin

Die Konzentration an Chlorpromazin (=CPZ) wurde von 0 bis 10^{-4} M ansteigend und die Konzentration an Desmethylchlorpromazin (=DCPZ) in gleichen Abständen entsprechend fallend so variiert, daß die Phenothiazin Gesamtkonzentration immer 10^{-4} M betrug. Ordinate: prozentualer Anteil α an freiem Phenothiazin (CPZ + DCPZ). Abszisse: ansteigende beziehungsweise abfallende Konzentration an Chlorpromazin beziehungsweise Desmethylchlorpromazin (10^{-5} M). Jeder Punkt der Kurve stellt einen Mittelwert aus zwei Einzelversuchen dar. Die dargestellten Geraden sind die entsprechenden Regressionsgeraden.

Tab. 1

 Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung
 für Perazin bei steigenden Hydroxyzinkonzentrationen.
 Perazingesamtkonzentration 10^{-4} M, α =prozentualer Anteil
 an freiem Perazin.

Hydroxyzin (10^{-4} M)	freies Perazin α -Wert (%)	Mittelwert der α -Werte (%)
0	32,3	29,4
0	26,4	
2	33,9	31,7
2	29,5	
4	34,7	32,2
4	29,7	
6	32,3	31,2
6	30,0	
8	32,5	32,2
8	31,9	
10	33,9	33,7
10	33,4	
13	34,0	34,4
13	34,7	
16	33,5	33,9
16	34,3	
20	35,6	36,6
20	37,6	

Tab. 2

 Bindungsvermögen einer 1%igen Kinderserumalbuminlösung
 für Chlorpromazin bei steigenden Hydroxyzinkonzentrationen.
 Chlorpromazingesamtkonzentration 10^{-4} M, α =prozentualer
 Anteil an freiem Chlorpromazin.

Hydroxyzin (10^{-4} M)	freies Chlorpromazin α - wert (%)	Mittelwert der α -Werte (%)
0	30,4	30,3
0	30,2	
2	30,3	30,8
2	31,2	
4	29,6	30,7
4	31,8	
6	29,7	32,6
6	35,5	
8	31,3	31,8
8	32,2	
10	32,5	32,3
10	32,1	
13	27,6	29,9
13	32,2	
16	25,1	28,6
16	32,1	
20	29,2	30,3
20	31,4	

Tab. 3

Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung
für Perazin bei steigenden Acetylsalicylsäurekonzentrationen
Perazingesamtkonzentration 10^{-4} M, α = prozentualer
Anteil an freiem Perazin.

Acetylsalicyl- säure (10^{-4} M)	freies Perazin α -Wert (%)	Mittelwert der α - Werte (%)
0	29,0	27,7
0	26,4	
2	29,7	29,1
2	28,4	
4	35,2	32,2
4	29,2	
6	30,2	31,1
6	31,9	
8	31,1	32,3
8	33,6	
10	31,6	30,8
10	30,0	
13	37,4	35,1
13	32,8	
16	40,3	39,4
16	38,4	
20	38,9	39,1
20	39,2	

Tab. 4

 Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung
 für Chlorpromazin bei steigenden Acetylsalicylsäurekon-
 zentrationen. Chlorpromazingesamtkonzentration 10^{-4} M,
 α = prozentualer Anteil an freiem Chlorpromazin.

Acetylsalicyl- säure (10^{-4} M)	freies Chlorpromazin α - Wert (%)	Mittelwert der α - Werte (%)
0	30,4	30,3
0	30,2	
2	31,4	31,6
2	31,8	
4	31,2	31,6
4	32,0	
6	33,7	32,2
6	30,7	
8	31,1	32,1
8	33,0	
10	34,7	35,2
10	35,6	
13	34,7	34,3
13	33,9	
16	35,1	34,5
16	33,8	
20	35,6	35,8
20	36,0	

Tab. 5

Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung für Desmethylchlorpromazin bei steigenden Acetylsalicylsäurekonzentrationen. Desmethylchlorpromazingesamtkonzentration 10^{-4} M, α = prozentualer Anteil an freiem Desmethylchlorpromazin.

Acetylsalicylsäure (10^{-4} M)	freies Desmethylchlorpromazin α - Wert (%)	Mittelwert der α -Werte (%)
0	37,4	37,0
0	36,5	
2	34,8	35,9
2	36,9	
4	37,7	38,2
4	38,7	
6	35,0	35,9
6	36,7	
8	36,5	37,9
8	39,3	
10	34,6	37,2
10	39,7	
13	37,0	37,9
13	38,8	
16	35,7	38,1
16	40,5	
20	37,0	38,4
20	39,7	

Tab. 6

 Bindungsvermögen einer 1%igen Rinderserumalbuminlösung
 für Desmethylchlorpromazin und Chlorpromazin in einem
 Lösungsansatz. Gesamtkonzentration in jedem Versuch 10^{-4} M ,
 Desmethylchlorpromazin von 10^{-4} M bis 0 fallend, Chlor-
 promazin von 0 bis 10^{-4} M steigend.

Desmethyl- chlorpromazin (10^{-5} M)	Chlorpromazin (10^{-5} M)	freies Desmethyl- chlorpromazin + Chlorpromazin (%)	Mittelwert der α -Werte(%)
10	0	37,8	36,8
10	0	35,7	
9	1	36,6	33,6
9	1	30,5	
8	2	34,4	33,3
8	2	32,1	
7	3	32,8	33,1
7	3	33,4	
6	4	32,8	33,0
6	4	33,2	
5	5	31,3	32,3
5	5	33,2	
4	6	28,6	29,9
4	6	31,2	
3	7	31,6	31,8
3	7	31,9	
2	8	31,3	30,5
2	8	29,6	
1	9	30,1	29,6
1	9	29,1	
0	10	30,4	30,3
0	10	30,2	

Komb. Nr.	Gleichung der Regressionsgeraden	n	r	Prüfung von r auf Unterschied gegen 0	Vergleich der Regressionskoeffizienten
1 Perazin (A) Hydroxyzin (B)	$y = 30.20 + 0.30 x$	18	0.73	$p < 1 \%$	1 mit 2 $p < 1 \%$
2 Chlorpromazin (A) Hydroxyzin (B)	$y = 31.40 + 0.07 x$	18	0.20	nicht signifikant	
3 Perazin (A) Acetyl-salicylsäure (B)	$y = 27.89 + 0.58 x$	18	0.87	$p < 1 \%$	3 mit 4 $p < 1 \%$
4 Chlorpromazin (A) Acetyl-salicylsäure (B)	$y = 30.73 + 0.26 x$	18	0.86	$p < 1 \%$	4 mit 5 $p < 5 \%$
5 Desmethyldeschlorpromazin (A) Acetyl-salicylsäure (B)	$y = 36.56 + 0.09 x$	18	0.33	nicht signifikant	

Tab. 7

Verdrängung von Chlorpromazin, Desmethyldeschlorpromazin und Perazin aus ihrer Albuminbindung durch Hydroxyzin und Acetylsalicylsäure. Das verdrängte Phenothiazinderivat ist mit (.) gekennzeichnet, das verdrängende Arzneimittel mit (s). In der Tab. sind die Ergebnisse der Korrelations- und Regressionsrechnungen zusammenfassend dargestellt.

n = Anzahl der Einzelversuche

r = Korrelationskoeffizient

4. DISKUSSION

4.1. Allgemeine Betrachtung von Verdrängungsreaktionen an den Bindungsstellen der Plasmaproteine

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen die unterschiedliche Beeinflußbarkeit der Proteinbindung von Chlorpromazin und Perazin durch Hydroxyzin und von Perazin, Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin durch Acetylsalicylsäure. Werden verschiedene Substanzen nacheinander einer Arzneimittel - Proteinlösung zugesetzt, so kann ihr Einfluß auf die Eiweißbindung des Arzneimittels unterschiedlich sein. Arzneimittel können sich gegenseitig aus ihrer Bindung an Eiweiß verdrängen oder auch eine Verstärkung ihrer Eiweißbindung bewirken. Diese zunächst widersprüchlich erscheinende Aussage wird verständlich, wenn man die Einzelvorgänge betrachtet, die nach Zusatz niedermolekularer Substanzen zugleich für das Bindungsvermögen einer Albuminlösung eine Rolle spielen können (Franz et al., 1969). Wenn zwei Pharmaka Affinitäten zu den gleichen Bindungsstellen am Albuminmolekül besitzen, werden sie sich gegenseitig aus ihrer Proteinbindung verdrängen, und folglich würde der Anteil der freien Substanz in der Lösung zunehmen.

Die gebundenen Arzneimittel können zugleich auch die Tertiärstruktur des Albuminmoleküls und damit auch dessen Bindungsvermögen beeinflussen (Scholtan, 1964 a; Scholtan u. Gloxhuber, 1966). Dies folgt aus der Tatsache, daß das Albuminmolekül mit steigender Arzneimittelkonzentration zunehmend anschwellen und sich auffalten kann (Klotz u. Ayers, 1953; Klotz et al., 1952). Dadurch erscheinen mehr Bindungsstellen an der Oberfläche des Proteinmoleküls und sein Bindungsvermögen wird erhöht. Diese Veränderungen der Proteinstruktur sind in Form von Viskositätsänderungen meßbar (Scholtan, 1964 a).

*Bindungsvermögen einer Albuminlösung
für niedermolekulare Substanzen*

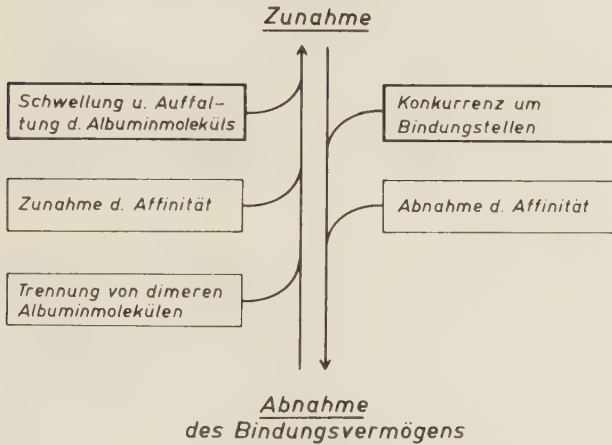


Abb.6

Einige Faktoren, die das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Arzneimittel beeinflussen können. Weitere Erläuterungen vgl. Text (nach Franz et al., 1969).

Neben der Konkurrenz um Bindungsstellen und der Auffaltung der Eiweißmoleküle können weitere Vorgänge auf die Eiweißbindung einwirken. In der Nachbarschaft eines gebundenen Arzneimittels kann die Bindungsstelle ihre Affinität ändern (Scholtan, 1964 b; Scholtan u. Gloxhuber, 1966), und dadurch kann das Bindungsvermögen abnehmen oder auch zunehmen. Zudem liegen Albuminmoleküle zum Teil in oligomerer Form vor (Foster, 1960) und besetzen so einen Teil ihrer Bindungsstellen selbst. Der Anteil des oligomeren Albumins könnte unter dem Einfluß von Arzneimitteln abnehmen. Das führt dazu, daß die Anzahl der Bindungsstellen vermehrt wird und dadurch das Bindungsvermögen der Albuminlösung zunimmt.

Das in Abb. 6 angegebene Schema zeigt einige der Faktoren auf, die das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Arzneimittel beeinflussen können. Diese verschiedenen Einzelvorgänge, wie Konkurrenz um Bindungsstellen, Änderung der Proteinstruktur, Änderung der Affinität von Bindungsstellen und Trennung von oligomeren Albuminmolekülen können gleichzeitig ablaufen, wenn niedermolekulare Substanzen einer Albuminlösung zugesetzt werden. Je nach dem Anteil der beteiligten Einzelvorgänge kann man eine Zunahme, eine Abnahme oder auch gar keine Veränderung des nicht an Eiweiß gebundenen Anteils finden. So kann es vorkommen, daß ein Verdrängungseffekt durch gleichzeitig zunehmendes Bindungsvermögen verdeckt wird. Besonders für stark gebundene Arzneimittel wurde dies nachgewiesen. Sie zeigten nur einen kleinen Verdrängungseffekt, da sie gleichzeitig die Tertiärstruktur des Albuminmoleküls besonders stark beeinflussen (Franz et al., 1969; Kunin, 1965). Bestimmungen des ungebundenen Anteils α des Arzneimittels nach Zusatz einer weiteren Substanz zu einer Arzneimittel-Proteinlösung lassen also nur bedingt eindeutige Rückschlüsse zu.

4.2. Beschreibung der Albuminbindung der untersuchten Phenothiazine auf Grund von Literaturbefunden

Die Natur der Wechselwirkung von Pharmaka mit Albumin ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Die Ladung eines Arzneimittels ist keine notwendige Voraussetzung für seine Bindung an Serumproteine. Für viele ungeladene Moleküle ist eine ionogene Bindung an Eiweiß auszuschließen (Scholtan, 1964 a). Ebenso können Wasserstoffbrückenbindungen für die Wechselwirkung der Pharmaka mit Serumproteinen keine entscheidende Rolle spielen. Cycloserin (Scholtan 1964 a) oder aliphatische Bisguanylhydrazone (Hofmann et al., 1969) werden nicht oder nur geringfügig an die Serumeiweiße gebunden, obwohl diese Moleküle mehrere zur Wasserstoffbrückenbindung fähige Gruppen enthalten. Verschiedene Autoren wiesen in neueren Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen dem hydrophoben Charakter beziehungsweise der Lipophilie und der Eiweißbindung niedermolekularer Substanzen nach (Hansch et al., 1962; Scholtan, 1968; Hansch u. Fujita, 1964; Hansch et al., 1965; Hansch, 1968; Franke, 1968; Bird u. Marschall, 1967; Glaßer u. Krieglstein 1970). Der hydrophobe Charakter der Substanzen wurde jeweils nach Hansch et al. (1962) durch Verteilungsversuche zwischen n-Oktanol und Wasser charakterisiert. Je mehr sich eine Substanz beim Verteilungsversuch in der organischen Phase anreicherte, je hydrophober die Substanz also war, um so stärker wurde sie vom Serumalbumin gebunden. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß hydrophobe Bindungen oder Wechselbeziehungen (Nemethy, 1967) eine wichtige Rolle bei der Bindung organischer Verbindungen an Eiweiß spielen. Der Ausdruck "hydrophobe Wechselbeziehungen" bedeutet, daß unpolare Gruppen in wäßriger Lösung die Tendenz haben, sich zu assoziieren und dadurch die Berührung mit benachbarten Wassermolekülen zu vermindern. Die Bildung hydrophober Bindungen ist durch einen Entropie-Effekt begünstigt. In der Umgebung einer unpolaren Gruppe sind die Wassermoleküle stärker geordnet. Bildet sich eine hydrophobe

Bindung, so nimmt die Ordnung ab, was zu günstigeren Entropieverhältnissen und damit zu einer negativen Reaktionsenergie führt. Es stellte sich jedoch heraus, daß ein Zusammenhang in Form einer linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus einer Größe der Eiweißbindung und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten nur innerhalb einer einheitlichen Substanzgruppe beziehungsweise zwischen strukturell ähnlichen Substanzen festzustellen ist (Scholtan, 1968). Demnach können bei der Eiweißbindung von organischen Arzneimittel-molekülen nicht nur hydrophobe Wechselbeziehungen vorliegen, sondern es ist auch mit anderen Bindungskräften, wie ionogenen Bindungen, wasserstoffbrückenbindungen, sterischen Effekten u.s.w. zu rechnen (Glaßer u. Krieglstein, 1970; Scholtan, 1968).

Für den Fall der Phenothiazine legen verschiedene Befunde den Schluß nahe, daß sie über hydrophobe Wechselwirkungen ihrer Benzolringe an Albumin gebunden sind:

1. Die Albuminbindung der Phenothiazinderivate mit Substituenten in Stellung 2 des Phenothiazinkerns nimmt mit ihrem hydrophoben Charakter zu (Glaßer u. Krieglstein, 1970). Die Substituenten scheinen den Dissoziationsgrad der Dimethylaminogruppe nicht signifikant zu beeinflussen (Green, 1967).
2. Einfache aromatische Substanzen, die ebenfalls an Albumin gebunden werden, sind in der Lage, Phenothiazinderivate von ihren Bindungsstellen am Albuminmolekül zu verdrängen. Eine ganze Reihe von aromatischen Verbindungen wie Benzoesäure, Anilin, Acetylsalicylsäure, Salicylsäure und 2,6 Dihydroxybenzoesäure können mit Phenothiazinen um die Bindung am Eiweiß konkurrieren (Jähnchen et al., 1969; Franz et al., 1969). Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die Benzolringe, die struktureller Bestandteil aller verwendeten Substanzen sind, miteinander in Konkurrenz treten.
3. Eine vergleichende Untersuchung der Albuminbindung von Promazin und Chlorpromazin machte deutlich, daß nur einer

der Phenothiazinbenzolringe an Albumin gebunden werden kann (Jähnchen et al., 1969).

Verschiedene Autoren haben daraufhingewiesen, daß die Eiweißbindung einer Substanz nach Demethylierung oder Desacetylierung einer Dimethylaminogruppe abnimmt (Hansch u. Fujita, 1964; Hansch et al., 1965). Dem entspricht die Tatsache, daß für verschiedene Arzneimittel gezeigt werden konnte, daß mit jedem weiteren Kohlenstoffatom beziehungsweise jeder weiteren CH_3 oder CH_2 -Gruppe im Molekül die Bindung an Eiweißkörper zunimmt (Fredericq, 1954 u. 1955; Hofmann et al., 1970; Scholtan, 1968). Aus diesem Grunde würde man für die Desmethylderivate einen geringeren Grad der Bindung an Eiweiß erwarten als für ihre verwandten Verbindungen. Desmethylchlorpromazin zeigte jedoch ohne Zusatz von Acetylsalicylsäure nur einen geringen Unterschied in seiner Albuminbindung im Vergleich zu Chlorpromazin. Nach den Befunden von Staab (1970) war nach Demethylierung von Promazin und Chlorpromazin die Bindung dieser Substanzen an Eiweiß nur wenig geändert, die Verteilungskoeffizienten verringerten sich dagegen auf ein Zehntel derjenigen der verwandten Verbindungen. Die Eiweißbindung ist nach Demethylierung also nicht mehr mit dem Verteilungskoeffizienten korreliert. Der hydrophobe Charakter nimmt stärker ab, als der Albuminbindung entsprechen würde. Die deutliche Dissoziation von Eiweißbindung und hydrophobem Charakter kommt auch bei der Berechnung der α -Werte mit Hilfe der Verteilungskoeffizienten und der Regressionsgleichungen zum Ausdruck. Die errechneten α -Werte von Desmethylchlorpromazin, Desmethylpromazin und Perazin weichen beträchtlich von den experimentell bestimmten ab, während die Eiweißbindung der übrigen Phenothiazinderivate ziemlich genau angegeben werden konnte. Analoge Verhältnisse lagen bei der Bestimmung der Albuminbindung von Imipramin und Desmethylimipramin vor (Glaßer u. Krieglstein, 1970). Desmethylchlorpromazin wird durch Acetylsalicylsäure nicht nachweislich aus seiner Bindung an Albumin verdrängt, während die Eiweißbindung von Chlorpromazin unter ihrem Einfluß

deutlich abnimmt (Tab. 4 u. 5 , Abb. 4) . Chlorpromazin wird durch Acetylsalicylsäure aus seiner Bindung an Albumin verdrängt, sie kann wahrscheinlich mit den Benzolringen des Phenothiazinringsystems konkurrieren. Auf Grund dieser Befunde kommt man zu dem Schluß, daß die Bindung der Seitenkette in Stellung 10 des Phenothiazingerüsts neben den hydrophoben Wechselwirkungen zusätzlich durch andere Kräfte bewirkt werden muß. Die Struktur der Seitenkette läßt in erster Linie an ionogene Bindungen denken. Diese Annahme wird durch die pK - Werte der Monodesmethylnmetaboliten gestützt, die höher waren als die der Ausgangsverbindungen (Green, 1957) . Nach Demethylierung scheinen von der Seitenkette ausgehende ionogene Bindungskräfte im gleichen Ausmaß zuzunehmen wie die hydrophoben Bindungskräfte abnehmen. Der Verlust an hydrophober Wechselwirkung könnte durch die Zunahme ionogener Bindungskräfte ausgeglichen werden. Das kann auch die Erklärung dafür sein, daß die Acetylsalicylsäure keinen nachweisbar verdrängenden Einfluß auf die Eiweißbindung des Desmethylnchlorpromazin ausübt. Perazin wird etwas stärker an Rinder-serumalbumin gebunden als Chlorpromazin. Die Acetylsalicylsäure verdrängte besonders in höheren Konzentrationen das Perazin stärker als Chlorpromazin. Die geringere verdrängung von Chlorpromazin im Vergleich zu Perazin aus der Albuminbindung wird durch die Substitution in Stellung 2 des Phenothiazingerüsts von Chlorpromazin bedingt sein. Auf die Bedeutung der Substitution an organischen Substanzen für die Eiweißbindung wurde bereits früher von verschiedenen Autoren hingewiesen. Besonders die Verstärkung der Albuminbindung einer organischen Substanz nach Einführung eines Chloratoms in das Molekül wurde schon für verschiedene Verbindungen und an verschiedenen Eiweißkörpern nachgewiesen (Bird et al. , 1967; Glaßer u.Krieglstein, 1970; Hansch et al. , 1962 u.1965; Krieglstein u. Kuschinsky, 1969; Kuntzmann et al.,1967; Scholtan, 1968). Perazin wurde durch Hydroxyzin aus seiner Eiweißbindung verdrängt, während

für Chlorpromazin ein Einfluß von Hydroxyzin nicht nachzuweisen war. Dieser Befund läßt sich folgendermaßen erklären: Perazin wird hydrophob durch einen der aromatischen Ringe an das Albumin gebunden. Im Unterschied zu Chlorpromazin oder Promazin hat Perazin in seiner Seitenkette wie Hydroxyzin einen piperazinring. Der Piperazinring der basischen Seitenkette kann durch ionogene Bindungskräfte an das Albuminmolekül gebunden werden. Perazin kann also in der basischen Seitenkette gleiche Bindungsstellen am Eiweiß wie das Hydroxyzin besitzen. Um diese gleichen Bindungsstellen der Seitenkette des Perazin und des Hydroxyzin am Albuminmolekül kann es zu einer Konkurrenz zwischen beiden Pharmaka kommen und so zu der Verdrängung von Perazin durch Hydroxyzin aus der Eiweißbindung. Für diese Annahme, daß die Seitenkette des Perazin vorwiegend ionogen gebunden ist, sprechen auch die Ergebnisse anderer Untersuchungen (Staab u. Krieglstein, 1970; Krieglstein et al., in Vorbereitung). Für Perazin wurde eine im Vergleich zu Promazin beträchtlich stärkere Eiweißbindung gefunden. Der Verteilungskoeffizient stieg jedoch nicht in dem gleichen Maße an, wie der Zunahme der Albuminbindung gegenüber Promazin entsprochen hätte, und die nach Literaturangaben errechneten Werte wichen von den experimentell bestimmten stark ab. Diese mangelnde Korrelation von Verteilungskoeffizient und Eiweißbindung deutet darauf hin, daß neben der hydrophoben Bindung andere Mechanismen Bedeutung gewinnen. Die Struktur der Seitenkette des Perazin in Stellung 10 des Phenothiazin-kerns läßt in erster Linie an ionogene Bindung denken.

4.3. Deutung des Phenothiazinalbuminkomplexes nach den vorliegenden Ergebnissen

Die Ergebnisse aus den vorliegenden und von früheren Untersuchungen (Franz et al., 1969; Glaßer u. Krieglstein, 1970; Krieglstein u. Kuschinsky, 1969) lassen folgende Annahmen über die Bindung der Phenothiazinderivate an Albumin zu: einer der Phenothiazinbenzolringe ist über hydrophobe Wech-

selwirkungen an das Albumin gebunden (Jähnchen et al., 1969). Die basische Dimethylaminogruppe ist wahrscheinlich über ionogene Bindungskräfte mit einer negativ geladenen Gruppe auf der Oberfläche des Proteins verbunden (Staab u. Krieglstein, 1970; Krieglstein et al. in Vorbereitung). Zwischen diesen beiden Teilen des Arzneimittelmoleküls, die mit dem Albumin verbunden sind, ist die aliphatische Seitenkette ausgespannt und nimmt offenbar nicht direkt an der Bindung teil. Ein weiterer Substituent wie die Methylgruppe von Trimeprazin ist in der Lage die Bindung des Moleküls durch hydrophobe Wechselwirkung zu verstärken. Die Methylgruppen am Stickstoff der Seitenkette könnten auch durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Beeinflussbarkeit der Eiweißbindung von Perazin und Chlorpromazin durch Hydroxyzin und von Perazin, Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin durch Acetylsalicylsäure untersucht. Dazu wurde die Bindung der Phenothiazine an Rinder Serumalbumin mit Hilfe der Sephadexgelfiltration bestimmt. Hydroxyzin konnte Perazin von seinen Albuminbindungsstellen verdrängen, der Anteil von freiem Chlorpromazin wurde jedoch in der Albuminlösung nicht erhöht. Perazin wurde zu einem höheren Grad durch Acetylsalicylsäure verdrängt als Chlorpromazin, der Prozentsatz an freiem Desmethylchlorpromazin stieg dagegen nach Zusatz von Acetylsalicylsäure zu der Albuminlösung nicht signifikant an. In einer Versuchsserie wurde untersucht, ob sich Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin in ihrer Proteinbindung gegenseitig beeinflussen. Es ergaben sich keine Hinweise für eine gegenseitige Verdrängung von Chlorpromazin und Desmethylchlorpromazin aus ihrer Albuminbindung. Die Ergebnisse gestatten die folgende Deutung des Phenothiazin - Albumin - Komplexes: Nur einer der Phenothiazinbenzolringe wird an eine hydrophobe Stelle am Albuminmolekül gebunden, während

die basische Dimethylaminogruppe mit einer negativ geladenen Gruppe an der Proteinoberfläche verbunden ist. Die aliphatische Seitenkette ist offenbar nicht direkt an der Bindung beteiligt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- AGGELER, P.M., R.A.O'REILLY, L. LEONY and P.F.KOWITZ:
Potentiation of anticoagulant effect of warfarin by
phenylbutazon.
New Engl. J.Med. 276, 496 - 501 (1967)
- ANTON, H.H.: A drug induced change in the distribution
and renal excretion of sulfonamides.
J. Pharmac. exp. Ther. vol 134, 291 - 303 (1961)
- BIRD, A.E. and A.C. MARSHALL: Correlation of serum binding
of penicillins with partition coefficients.
Biochem. Pharmacol. 16, 2275 - 2290 (1967)
- BRODIE, B.B.: Displacement of one drug by another from
carrier or receptor sites.
Proc. roy. Soc. Med. 58, 946 - 955 (1965)
- BÜTTNER, H. u. F. PORTWICH: Kompetitionsphänomene bei der
Bindung von Pharmaka an Albumin.
Klin. Wschr. 45, 225 - 230 (1967)
- CHRISTENSEN, L.K., J.M. HANSEN and M. KRISTENSEN:
Sulphaphenazole - induced hypoglycämic
attacks in tolbutamide - treated diabetics.
Lancet 1963 II, 1298 - 1301 (1963)
- FOSTER, J.F.: Plasma Albumin. In: The Plasma Proteins,
Vol.I, ed. F. W. Putnam, pp. 179 - 239. London - New
York: Academic Press 1960
- FRANKE, R.: Die hydrophobe Wechselwirkung von poly-
cyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit
Humanserumalbumin.
Biochem. Biophys. Acta, 160, 378 - 395 (1968)

FRANZ, J.W., E.JÄHNCHEN u. J.KRIEGLSTEIN:

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin.

Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 264, 462-475 (1969)

FREDERICQ, E.: Interactions de protéines et d'ions en solution. 1. Influences de structure dans les associations entre protéines et anions organiques. Bull. Soc. Chim. Belg. 62, 198 - 211 (1954)

FREDERICQ, E.: Interactions de protéines et d'ions en solution. 2. Energie d'association de la serum-albumine et d'anions organiques. Bull. Soc. Chim. Belg. 64, 639 - 657 (1955)

GEIGY, J.R., A.G.: Pharmazeutische Abteilung: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. Basel (1960)

GLASSER, H. u. J.KRIEGLSTEIN: Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit trizyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer chemischen Konstitution. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 265, 521 (1970)

GOLDSTEIN, A.: The interactions of drugs and plasma proteins. Pharmacol. Rev. 1, 102 - 165 (1949)

GREEN, A.L.: Ionisation constants and water solubilities of some aminoalkylphenothiazine tranquillizers and related compounds. J. Pharm. Pharmac. 19, 10 - 16 (1967)

HANSCH, C., P.P.MALONEY and T. FUJITA: Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with hammett substituent constants and partition coefficients. Nature (Lond.) 194, 178 - 180 (1962)

HANSCH, C. and T.FUJITA: $\rho - \sigma - \pi$ analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. J. Am. chem. Soc. 86, 1616 - 1624 (1964)

- HANSCH, C., K.KIEHS and G.L.LAWRENCE: The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins.
J.Am.chem.Soc. 87, 5770 - 5773 (1965)
- HANSCH, C.: The use of homolytic, steric and hydrophobic constants in a structure-activity study of 1,3 benzodioxole synergists.
J.med.Chem. 11, 920 - 924 (1968)
- HOFFMANN, P., J.KRIEGLSTEIN, E.MUTSCHLER u. U.WOLLERT: Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanylhydrazone mit Hilfe der Sephadexgelfiltration.
Arzneim.-Forsch. 20, 681 (1970)
- JÄNNICHEN, E., J.KRIEGLSTEIN u. G.KUSCHINSKY: Die Bedeutung der Benzolringe bei der Eiweißbindung von Promazin und Chlorpromazin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.f.Pharmak. exp. Path. 263, 375 - 386 (1969)
- KEEN, P.H.: The displacement of three anionic drugs from binding to bovine serum albumin by various anionic compounds.
Brit.J.Pharmacol. 26, 704 - 712 (1966)
- KLOTZ, J.M., R.K.BURKHARD and J.M.URQUART: Structural specificities in the interactions of some organic ions with serum albumin.
J.Am.chem.Soc. 74, 202 - 208 (1952)
- KLOTZ, J.M. and J.AYERS: Protein interactions with organic molecules.
Discussion Faraday Soc. 13, 189 - 196 (1953)
- KRIEGLSTEIN, J., G.KUSCHINSKY: Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration.
Arzneim.-Forsch. 18, 287 - 289 (1968)
- KRIEGLSTEIN, J.: Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.
Klin.Wschr. 47, 21, 1125 - 1130 (1969)

- KRIEGLSTEIN, J., W.MEILER and J.STAAB: Hydrophobic and ionic interactions of phenothiazine derivatives with bovine serum albumin.
In Vorbereitung
- KUNIN, C.M.: Enhancement of antimicrobial activity of penicillin and other antibiotics in human serum by competitive serum binding inhibitors.
Proc.Soc.Experim.Biol.Med. 117, 69-73 (1964)
- KUNIN, C.M.: Inhibitors of penicillin binding to serum proteins.
J.Lab.Clin.Med. 62, 416-431 (1965)
- KUNTZMANN, R., I.ISAI and J.J.BURNS: Importance of tissue and plasma binding in determining the retention of norchlorcyclizine and norcyclizine.
J.Pharmacol.exp.Ther. 120, 552-559 (1967)
- MEYER, H.C. and D.L.GUTMAN: The binding of drugs by plasma proteins.
J.pharm.Sci. 57, 895-918 (1968)
- NEHETHY G.: Hydrophobe Wechselwirkungen.
Angew.Chem. 79, 260-271 (1967)
- RÖMPP, H.: Chemie Lexikon, Stuttgart 1966 S.2324 und 5852-5853
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden,
Berlin, Heidelberg, New York 1968
- SCHOLTAN, W.: Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Eiweißbindung von Sulfonamiden und Penicillinen.
Chemotherapia 12, 103-134 (1964 a)
- SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.
5.Mitteilung: Sulfonamid-Bindungsvermögen und optisches Drehungsvermögen der Serumeiweißkörper.
Arzneim.-Forsch. 14, 1234-1238 (1964 b)

SCHOLTAN, W. u. C.GLOXHUBER: Die Eiweißbindung von Bilirubin und Bromsulfalein.

Arzneim.-Forsch. 16, 520-528 (1966)

SCHOLTAN, W.: Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäure.

Arzneim.-Forsch. 18, 505-517 (1968)

SOLOMON, H.W., J.H.SCHROGIE and D.WILLIAMS: The displacement of phenylbutazone-¹⁴C and warfarin-¹⁴C from human albumin by various drugs and fatty acids.

Biochem. Pharmacol. 17, 143-151 (1968)

STAAB, J. u. J.KRIEGLSTEIN: Die Beteiligung der basischen Seitenkette von Rhenthiazinderivaten an deren Albuminbindung.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. 266, 456-457 (1970)

LEBENS LAUF

Am 12. November 1945 wurde ich als Sohn des Keramik-
ingenieurs Friedrich Meiler und seiner Ehefrau Elfriede,
geb. Jude, in Höhr - Grenzhausen im Unterwesterwald-
kreis geboren. Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volks-
schule in Grenzhausen, anschließend die Realschule in
Höhr - Grenzhausen, die ich 1962 mit dem Zeugnis der Mitt-
leren Reife verließ. 1962 wechselte ich zum Neusprachlichen
Gymnasium in Koblenz über und bestand dort im März 1965
die Reifeprüfung.

Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1965
an der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz. Ein
Jahr später legte ich die naturwissenschaftliche, im April
1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Juni 1971 beendete
ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg - Univer-
sität in Mainz mit dem Staatsexamen.

Seit 1. September 1971 arbeite ich als Medizinalassistent
in der 1. Medizinischen Klinik der Universität Mainz.

